Docket No. 243990US0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

OIPE
OCT 0 5 2004
PATENT & TRADEMARK OFFICE
JC25

IN RE APPLICATION OF: Yoshio HAYASHI

GAU: 1614

SERIAL NO: 10/685,448

EXAMINER:

FILED: October 16, 2003

FOR: METHOD FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES AND SCREENING METHOD FOR PREVENTIVE OR THERAPEUTIC AGENT FOR THE SAME

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §120**.

☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119(e)**: **Application No.** **Date Filed**

■ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119**, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY	APPLICATION NUMBER	MONTH/DAY/YEAR
Japan	2003-123959	April 28, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

☒ is being submitted herewith

☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

☐ were filed in prior application Serial No. filed

☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and

☐ (B) Application Serial No.(s)

☐ are submitted herewith

☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

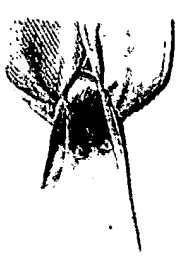
Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon

Daniel J. Pereira, Ph.D.
Registration No. 45,518

Customer Number
22850
Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

10/685,445



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月28日

出願番号
Application Number: 特願2003-123959

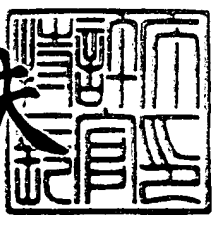
[ST. 10/C]: [JP2003-123959]

願人
Applicant(s): 興和株式会社

2003年10月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

出証番号 出証特2003-3084532

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】　特許願
【整理番号】　P01741504
【特記事項】　特許法第３０条第１項の規定の適用を受けようとする特許出願
【あて先】　特許庁長官殿
【発明者】
　【住所又は居所】　徳島県徳島市城南町２丁目１番８－３０１
　【氏名】　林　良夫
【特許出願人】
　【識別番号】　000163006
　【氏名又は名称】　興和株式会社
【代理人】
　【識別番号】　110000084
　【氏名又は名称】　特許業務法人アルガ特許事務所
　【代表者】　中嶋　俊夫
【選任した代理人】
　【識別番号】　100068700
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　有賀　三幸
【選任した代理人】
　【識別番号】　100077562
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　高野　登志雄
【選任した代理人】
　【識別番号】　100096736
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　中嶋　俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】　100089048

【弁理士】

【氏名又は名称】　浅野　康隆

【選任した代理人】

【識別番号】　100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】　的場　ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】　100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】　村田　正樹

【選任した代理人】

【識別番号】　100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】　山本　博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】　164232

【納付金額】　21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】　明細書　1

【物件名】　図面　1

【物件名】　要約書　1

【プルーフの要否】　要

【書類名】　明細書

【発明の名称】　自己免疫疾患の予防・治療剤及びそのスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項１】　RBAp48産生抑制剤又は阻害剤を有効成分とする自己免疫疾患の予防・治療剤。

【請求項２】　自己免疫疾患がシェーグレン症候群である請求項１記載の予防・治療剤。

【請求項３】　被検体のRBAp48産生抑制作用又は阻害作用を測定することを特徴とする、自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

【請求項４】　自己免疫疾患がシェーグレン症候群である請求項３記載の方法。

【請求項５】　腺組織中RBAp48濃度測定試薬を含有することを特徴とする自己免疫疾患の診断剤又は診断用キット。

【請求項６】　自己免疫疾患がシェーグレン症候群である請求項５記載の診断剤又は診断用キット。

【請求項７】　腺組織中RBAp48濃度を測定することを特徴とする自己免疫疾患の判定方法。

【請求項８】　自己免疫疾患がシェーグレン症候群である請求項７記載の判定方法。

【請求項９】　被検体のRBAp48産生抑制作用又は阻害作用を測定することを特徴とするアポトーシス阻害剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、自己免疫疾患の予防・治療剤、そのスクリーニング方法及び自己免疫疾患判定方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

自己免疫疾患とは、個体自身を構成する成分（自己抗原）に対する抗体（自己

抗体）や、自己抗原に対するＴ細胞によって引き起こされる疾患であり、特定の臓器がおかされるものから、全身的に症状が広がるものまで、様々なタイプが知られている。自己抗体は、細胞を破壊したり（自己免疫性溶血性貧血等）、生理機能を妨害したり（重症筋無力症等）、受容体を異常に刺激したり（バセドウ病（グレーヴス病）等）、抗原抗体複合体（免疫複合体）として血管壁に沈着し炎症を起こす（全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）等）など、様々な働きをする。一般に、自己抗原に対して個体は免疫応答しない（自己寛容）が、何らかの原因で自己寛容が崩壊すると自己免疫疾患になると考えられている。しかし、一般的な原因の特定はなされていない。従って、その治療方法は対症的なものが主であり、今だ十分確立された治療方法があるとは言い難いのが現状である。

【０００３】

自己免疫疾患の内、シェーグレン症候群は、涙腺・唾液腺を始めとする全身の外分泌腺に系統的な慢性炎症をきたし、外分泌腺の機能低下に基く乾燥症状、例えば乾燥性角結膜炎、慢性唾液腺炎による乾燥症候群等を主特徴とする疾患として知られている。その病因としては、何らかの遺伝的素因に加えて、免疫異常、未知の環境要因等が関与することが推測されているが、やはり詳細は不明であり、根本的な経過に対する特異的な治療法はない。

【０００４】

病因解明へのアプローチの一つとして、シェーグレン症候群をはじめとする自己免疫疾患の多くが、閉経期以降の女性を中心に発症するという事実が注目される。すなわち、エストロジェンの欠乏によって標的臓器に何らかの変化が起きることが想定される。これを支持する知見として、本発明者は、シェーグレン症候群のモデルマウスを用いた検討において、エストロジェンの欠乏が、腺細胞のアポトーシスを介して病態を悪化させ、また、この悪化をエストロジェン補給により防御できることを報告している（非特許文献１参照）。

【０００５】

一方RBAp48（retinoblastoma associated protein 48）は、癌抑制遺伝子産物として知られているＲｂ蛋白質と複合体を形成する核蛋白質として、そのヒト型遺伝子が１９９３年にクローニングされた（非特許文献２参照）。その機能とし

ては、ヒストン脱アセチル化酵素複合体の構成成分の一つとして、細胞の分化・増殖の調節に関与するとの報告がある（非特許文献３、４参照）。しかし、RBAp48が自己免疫疾患の病態改善に対してどのような作用をするかは全く知られていない。

【０００６】

【非特許文献１】

Ishimaru N et al. Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjogren's syndrome through fas-mediated apoptosis. Am. J. Pathol. 155(1), 173-81(1999)

【非特許文献２】

Qian YW et al. A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. Nature 364(6438), 648-52(1993)

【非特許文献３】

Qian YW et al. Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. J. Biol. Chem. 270(43), 25507-13(1995)

【非特許文献４】

Nicolas E et al. RBAp48 belongs to the histone deacetylasecomplex that associates with the retinoblastoma protein. J. Biol. Chem. 275(13), 9797-804(2000)

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、従来は根本的治療法が知られていない自己免疫疾患の予防・治療剤、そのスクリーニング方法及び自己免疫疾患判定方法を提供することにある。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

上記のような実状を勘案し、本発明者らは鋭意研究を行った結果、自己免疫疾患、特にシェーグレン症候群の標的臓器である唾液腺に、エストロジェン欠乏に

よって発現する因子の一つとしてRBAp48を見出し、RBAp48の導入により唾液腺細胞のアポトーシスが確認されたことから、腺組織中のRBAp48濃度を測定すれば自己免疫疾患の診断が可能であること；また被検体のRBAp48産生抑制作用又は阻害作用を測定すれば自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニングが可能であること；さらに、RBAp48産生抑制剤又は阻害剤がシェーグレン症候群をはじめとする自己免疫疾患に対して優れた予防・治療効果を有し、医薬として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【０００９】

すなわち本発明は、RBAp48産生抑制剤又は阻害剤を有効成分とする自己免疫疾患の予防・治療剤；被検体のRBAp48産生抑制作用又は阻害作用を測定することを特徴とする自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法；さらには腺組織中RBAp48濃度測定試薬を含有することを特徴とする自己免疫疾患の診断剤又は診断用キット、並びに判定方法を提供するものである。

【００１０】

【発明の実施の形態】

本発明の自己免疫疾患の予防・治療剤の有効成分として用いられるRBAp48産生抑制剤又は阻害剤としては、RBAp48の機能を阻害するものであれば何でも良く、例えばRBAp48遺伝子のアンチセンスオリゴヌレオチドやRBAp48に特異的な転写因子を阻害する等のRBAp48の遺伝子発現自体を阻害するもの、二重鎖RNAによるRNA干渉作用等によってRBAp48遺伝子のmRNAを特異的に分解するもの、RBAp48の蛋白質発現を阻害するもの、RBAp48の発現後修飾を阻害するもの、RBAp48の機能的抗体等に代表されるRBAp48の機能自体を阻害するもの等が挙げられる。

【００１１】

本発明の自己免疫疾患の予防・治療剤を使用するにあたり、投与量、投与部位、投与間隔、投与期間等は投与対象の患者の性別、年齢、体重、病状、併用することもある他の薬剤や治療法の種類等を考慮して決定される。また、本発明の自己免疫疾患の予防・治療剤の剤型には特別の制限はなく、有効成分であるRBAp48産生抑制剤又は阻害剤は、単独又は他の薬学的に許容される溶解剤、賦形剤、結合剤、希釈剤等の担体を用いて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、粉末剤、ローショ

ン剤、軟膏剤、注射剤、坐剤等の剤型とすることができる。これらの製剤は、公知の方法で製造することができる。例えば、経口投与用製剤とする場合には、トラガントガム、アラビアガム、ショ糖エステル、レシチン、オリーブ油、大豆油、PEG400等の溶解剤、澱粉、マンニトール、乳糖等の賦形剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、軽質無水ケイ酸等の流動性向上剤等を適宜組み合わせて処方することにより製造することができる。

【００１２】

本発明の自己免疫疾患の予防・治療剤は、経口投与又は非経口投与により投与される。本発明の自己免疫疾患予防・治療剤の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、一日0.01～1000ｍｇ、好ましくは0.1～100ｍｇを１回又は数回に分けて投与するのが好ましい。

【００１３】

かくして得られる本発明の自己免疫疾患の予防・治療剤は、様々な自己免疫疾患、例えば橋本甲状腺炎、ＳＬＥ、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、受容体自己免疫疾患、バセドウ病（グレーヴス病）、重症筋無力症、インスリン抵抗性、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性脳脊髄炎、リウマチ、強皮症、混合結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、一部の不妊、糸球体腎炎、水疱性天疱瘡、シェーグレン症候群、一部の糖尿病、アドレナリン作動薬耐性、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、内分泌腺不全、白斑、血管炎、心術後症候群、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、一部の喘息の他、原因不明の炎症性・肉芽腫性・変性及び萎縮性の疾患等の予防・治療に有用である。

【００１４】

本発明の自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法としてのRBAp48産生抑制作用又は阻害作用の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができる。例えば、ヒト唾液腺細胞等の腺細胞にRBAp48の遺伝子を導入し、RBAp48産生能を高めた細胞はアポトーシスを引き起こすが、この細胞に対して、予め被検体を添

加することでアポトーシスが抑制されれば、当該被検体は自己免疫疾患の予防・治療剤として有用であると判定できる。また、RBAp48産生抑制作用又は阻害作用は、前記RBAp48産生能を高めた細胞のアポトーシスによっても測定できるが、当該細胞のRBAp48遺伝子の測定、RBAp48自体の直接測定によっても判定することができる。さらには、同一の試験系において、アポトーシス阻害作用を有する物質のスクリーニングも可能であることは明らかである。

【００１５】

本発明の自己免疫疾患の判定方法としては、腺組織中のRBAp48濃度又はRBAp48遺伝子発現を公知の方法に準じて測定することにより行うことができる。RBAp48濃度の測定法としては、免疫学的方法が好ましく、例えばELISA法等を用いて測定するのがより好ましい。

RBAp48遺伝子発現の測定法としては、PCR法、ノーザンブロット法、遺伝子チップ法等が挙げられる。ここで腺組織としては、唾液腺、涙腺、甲状腺、膵外分泌腺、肝内胆管、汗腺、乳腺、ハーダー腺、前立腺、尿道球腺等が挙げられる。これらの腺組織は、バイオプシー（生検）、オートプシー（剖検）等により被検者から採取することができる。また、これらの測定法は腺組織以外の検体にも応用でき、例えば、被検者から採取した血清、唾液、涙液、胆汁、膵液、髄液、尿等に含まれるRBAp48、又はRBAp48に関連する因子（結合タンパク、抗体、誘導タンパク、変性タンパクなど）等の測定によっても、本発明を実施することができる。

【００１６】

また、本発明の自己免疫疾患診断剤としては、腺組織中のRBAp48濃度を測定できる試薬を含有していればよく、例えば免疫学的測定試薬の場合には、抗RBAp48モノクローナル抗体、抗RBAp48ポリクローナル抗体等を含む試薬が挙げられる。また、当該診断剤には、さらに標識第二抗体、標識抗RBAp48モノクローナル抗体、標識抗RBAp48ポリクローナル抗体等の標識体を含むのが好ましい。またその標識としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。

【００１７】

【実施例】

以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【００１８】

実施例１（正常マウスにおける唾液腺細胞のアポトーシス）

C57BL/6マウスおよびエストロジェンレセプターノックアウト（ＥＲαＫＯ）マウスに卵巣摘出（Ovx）を施し、唾液腺細胞のアポトーシスを施術後６週まで経時的に観察した。アポトーシスは、唾液腺組織切片のＴＵＮＥＬ染色を行い、その染色率（TUNEL index）により評価した。なお比較対照として、Ovxを行わない偽手術群（Sham）を用意した。その結果、図１に示すように、卵巣摘出を施されたC57BL/6マウスの唾液腺おいて、Ovx後２週および３週目にて一過性のアポトーシスが観察された。一方、ＥＲαＫＯマウスの唾液腺細胞では、アポトーシス細胞の増加は認められなかった。従って、唾液腺細胞のアポトーシスにエストロジェンの欠乏が関わることが確認された。

【００１９】

実施例２（培養細胞におけるアポトーシスの誘導）

常法に従い培養した各種の培養細胞（マウス唾液腺細胞株（MSG：B6、ERαKOの２種）、ヒト唾液腺細胞株（HSG）、ヒト乳ガン培養細胞株（MCF-7）、ヒト急性Ｔ細胞性白血病細胞株（Jurkat）およびヒト大腸癌培養細胞株（HT-29、Colo 201））に対し、エストロジェンのアンタゴニストであるタモキシフェン(Tam：終濃度；10^{-7}M)を作用させ、アポトーシス、唾液腺特異的自己抗原への影響を観察し、カスパーゼを中心としたアポトーシス関連プロテアーゼの活性を検討した。なお陽性対照として、アポトーシス誘導剤であるStaurosporin（終濃度；10^{-6}M）を用いた群を用意した。Tam添加後４８時間における各細胞のアポトーシスをフローサイトメータにてAnnexin-V-FITCを用いて検討した結果、図２に示すごとくMSG細胞(B6)、HSG細胞にてTam無添加群に比較してアポトーシスの割合の有意な上昇が認められた。なおMCF-7は、Tamにてアポトーシスが誘導されることが知られている細胞株である。ERαKOマウス由来のMSG細胞では、Tamによりアポトーシスは観察されなかった。一方、Staurosporinの添加群ではすべての細胞に高率にアポトーシスが認められ、細胞間での差異は見られなかった。また、唾液腺細

胞のTamにより誘導されたアポトーシスは、エストラジオール（E2：終濃度；10^{-9}M、添加時間；Tam刺激前24時間）による前処理にて抑制されることが判明し、Tamによる唾液腺細胞のアポトーシスがエストロジェンを介していることが示唆された。

【００２０】

実施例３（抗エストロジェン作用によって誘導される遺伝子の同定）

HSG細胞を用い、無刺激細胞を対照としてTam刺激にて強発現したmRNAを常法にて抽出し、ディファレンシャルデスプレイ法（RNA image kit, Gene Hunter™、東洋紡）により単離した遺伝子断片を大腸菌内にトランスフォーメーション、クローニングした後、複数の単離遺伝子断片をプローブとしてタモキシフェン（終濃度；10^{-7}M）にて発現が増強し、エストラジオール添加（終濃度；10^{-9}M）にてその発現が低下するmRNAをHSG細胞を用いて図３に示すごとくノーザンブロット法にて検討し、当該遺伝子断片のアミノ酸配列を常法によるシークエンス解析を行ったところ、RBAp48遺伝子が同定された。HSG細胞におけるRBAp48 mRNAはTam刺激2時間で強い発現を認めた。さらに、正常ヒト臓器mRNAを用いたRBAp48発現をノーザンブロットにて解析すると、唾液腺組織では検索した組織の中では最も発現が低く、精巣、脂肪組織にて強い発現を認めることが判明した。これらの結果は、正常唾液腺細胞での発現の低いRBAp48が、抗エストロジェン作用による発現増強が起こる可能性を示唆している。

【００２１】

実施例４（各種細胞株へのRBAp48遺伝子導入によるアポトーシスの検討）

RBAp48の唾液腺細胞での機能的役割を知るためにTam刺激にて用いた細胞を含め各種細胞株（CCSK；ヒト胆管細胞癌細胞株、SH-SY5Y;ヒト神経細胞株、Raji；ヒトB細胞株、THP-1, U937;ヒト単球性白血病細胞株）を用い、pCMVベクターに挿入されたRBAp48遺伝子（終濃度；1μg/ml）をリポフェクション法により導入し、４８時間後のアポトーシスの割合をAnnexin-V-FITCを用いてフローサイトーメータにより解析した結果、B6マウス由来MSG細胞、ERαKOマウス由来MSG細胞、HSG細胞でのアポトーシスの割合はベクターのみのMock導入群に比較して有意に上昇し、p53KOマウス由来MSG細胞を含め他の細胞株ではRBAp48遺伝子過剰発現に

よるアポトーシスは観察されなかった（図４）。これらの結果は、唾液腺細胞がRBAp48の発現により特異的にアポトーシスが誘導され、そのアポトーシスはエストロジェンレセプター以降の下流シグナルを介し、p53分子が重要な役割を示す可能性を示唆している。

【００２２】

実施例５（RBAp48-stable cell lineの樹立とアポトーシス経路の検討）

培養系へのIPTG添加により安定的にRBAp48の発現調節が可能なStable cell lineを、LacSwitch II Inducible Mammalian Expression System（STRATEGENE)を用い、HSG細胞より樹立した（RHO細胞）。図５に示すごとく、IPTG添加２時間後より12時間まで経時的にアポトーシスの割合が上昇し、RBAp48タンパクの発現もこのアポトーシスの推移との相関が認められた。また、RHO細胞についてIPTG添加後６時間での細胞溶解物における細胞周期関連分子であるRB、リン酸化RB、CyclinD3、p19ARFについて各抗体（BD　Trabsduction Laboratory）を用いてウエスタンブロット法にて検討した結果、各種RBタンパクの発現に変化はなかったが、IPTG添加によりRBのリン酸化、CyclinD3およびp19ARFの発現増強が認められた。さらに、IPTG添加RHO細胞の核抽出物を用いたゲルシフトアッセイによるE2F-1の転写活性の上昇が示唆された（図５）。

【００２３】

実施例６（RBAp48誘導性アポトーシスへのRBAp48 siRNAによる効果）

RBAp48のsiRNAを作成（センス；CGA GGA AUA CAA AAU AUG GTT（配列番号１），アンチセンス；CCA UAU UCU GUA UUC CUC GTT（配列番号２））し、RBAp48-stable cell lineに導入することによりRBAp48を介したアポトーシスに影響するか否かを検討した。図6に示すごとく、RBAp48 siRNA（終濃度；0.5～100nM）をリポフェクション法にてRHO細胞に導入し、導入24時間後にIPTGを添加し8時間の培養後にAnnexin-V-FITCを用い、フローサイトメータにてアポトーシスの割合を検討した。IPTGの添加により誘導されるアポトーシスは50nMのRBAp48 siRNAの導入により有意に抑制されることが観察された。一方、GAPDH siRNAおよび非機能的対照siRNAの導入ではIPTG添加で誘導された唾液腺細胞のアポトーシスには影響を示さなかった。

【００２４】

以上の結果から、閉経期の女性に多発する自己免疫疾患の発症の分子機構にRBAp48が重要な役割を果たしていることが明らかにされ、標的細胞のアポトーシス阻害による、自己免疫疾患に対する新規治療法開発の可能性が強く示唆された。RBAp48阻害による難病克服の臨床応用が可能となれば、社会的貢献度は多大なものと考えられる。

【００２５】

【発明の効果】

本発明によれば、従来は根本的治療法が知られていない自己免疫疾患の予防・治療剤、そのスクリーニング方法及び自己免疫疾患判定方法を得ることができる。

【００２６】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kowa Co., Ltd

<120> Medicine for autoimmune disease and screening method therefor

<130> P01741504

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223>　Designed RNA based on RBAp48 gene

<400>　1

cgaggaauac aaaauauggt t　　21

<210>　2

<211>　21

<212>　RNA

<213>　Artificial Sequence

<220>

<223>　Designed RNA based on RBAp48 gene

<400>　2

ccauauucug uauuccucgt t　　21

【図面の簡単な説明】

【図１】

正常マウスにおける唾液腺細胞のアポトーシスを示す図である。図１中、TUNEL indexは染色率を、Ovxは卵巣摘出群を、Shamは偽手術群を、Week after Ovxは卵巣摘出手術後の経過週を示す。

【図２】

培養細胞におけるアポトーシスの誘導を示す図である。図２中、Apoptotic cellsはアポトーシスの割合を、Mediumはコントロール群を、Tamはタモキシフェン添加群を、Staurosporinはスタウロスポリン添加群を、E2はエストラジオール添加群を、E2＋Tamはエストラジオール及びタモキシフェン添加群を示す。

【図３】

抗エストロジェン作用によって誘導される遺伝子を示す図である。図３中、Mediumはコントロール群を、Tamはタモキシフェン添加群を、E2＋Tamはエストラジオール及びタモキシフェン添加群を示す。

【図４】

各種細胞株へのRBAp48遺伝子導入によるアポトーシスを示す図である。図４中、Apoptotic cellsはアポトーシスの割合を示す。

【図５】

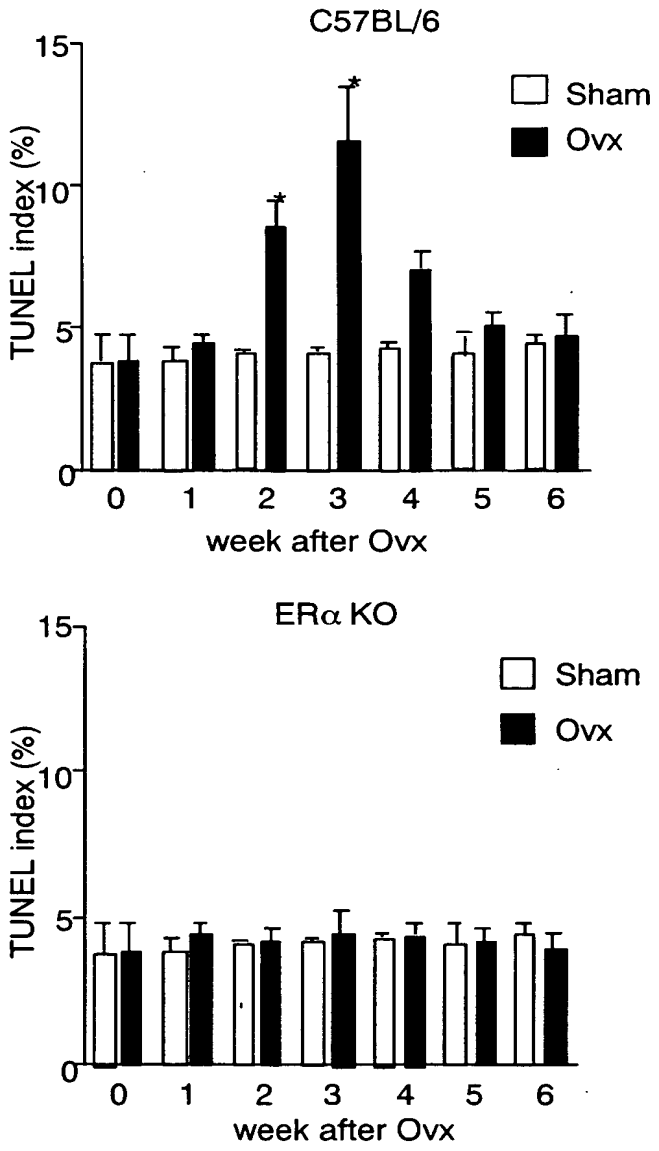
RBAp48-stable cell lineのアポトーシスを示す図である。図５中、Apoptotic cellsはアポトーシスの割合を、IPTGはイソプロピル-β-D-チオガラクトシドを示す。

【図６】

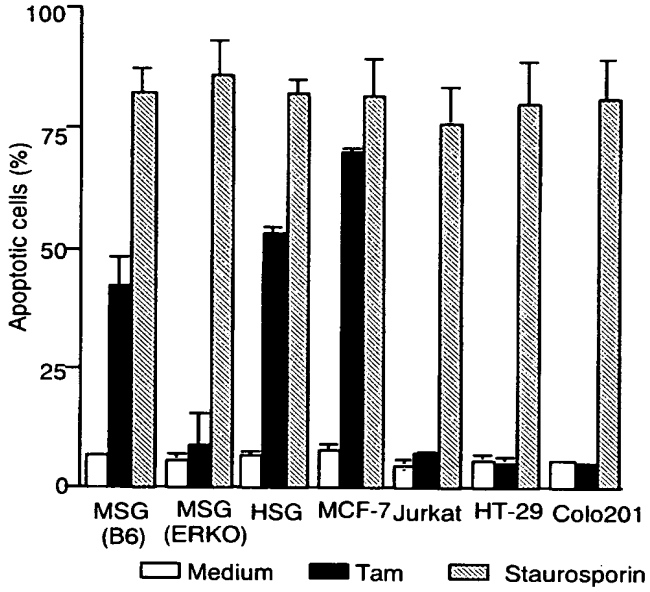
RBAp48誘導性アポトーシスへのRBAp48 siRNAの効果を示す図である。図６中、Apoptotic cellsはアポトーシスの割合を示す。

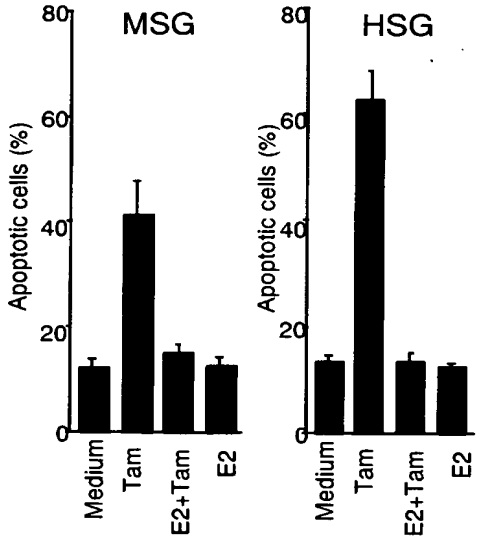
【書類名】　図面

【図１】

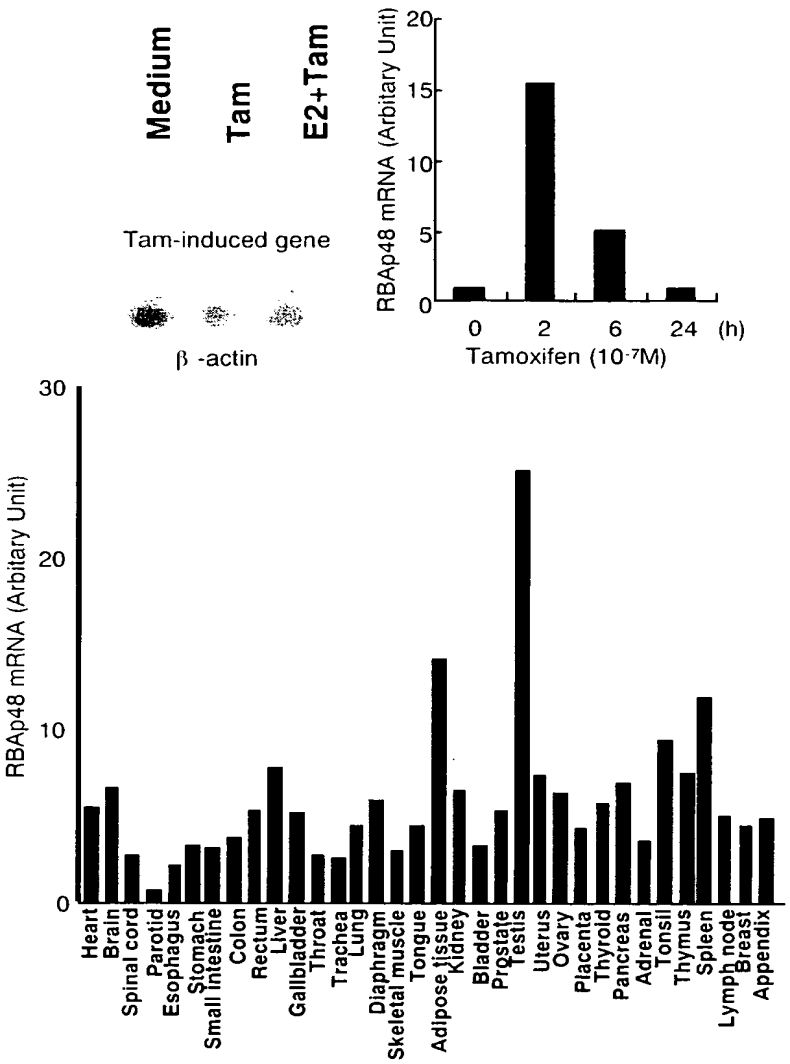

C57BL/6
Sham
Ovx
TUNEL index (%)
15
10
5
0
*
*
0 1 2 3 4 5 6
week after Ovx
ERα KO
Sham
Ovx
TUNEL index (%)
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6
week after Ovx

【図２】

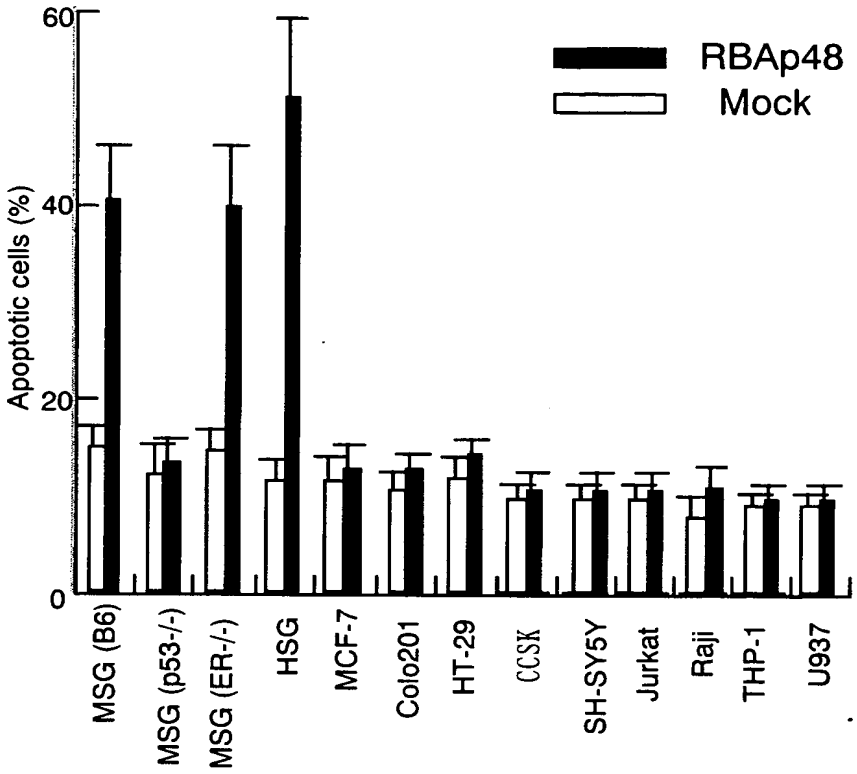

100
75
50
25
0
Apoptotic cells (%)
MSG (B6)
MSG (ERKO)
HSG
MCF-7
Jurkat
HT-29
Colo201
Medium
Tam
Staurosporin


MSG
HSG
80
60
40
20
0
Apoptotic cells (%)
Medium
Tam
E2+Tam
E2

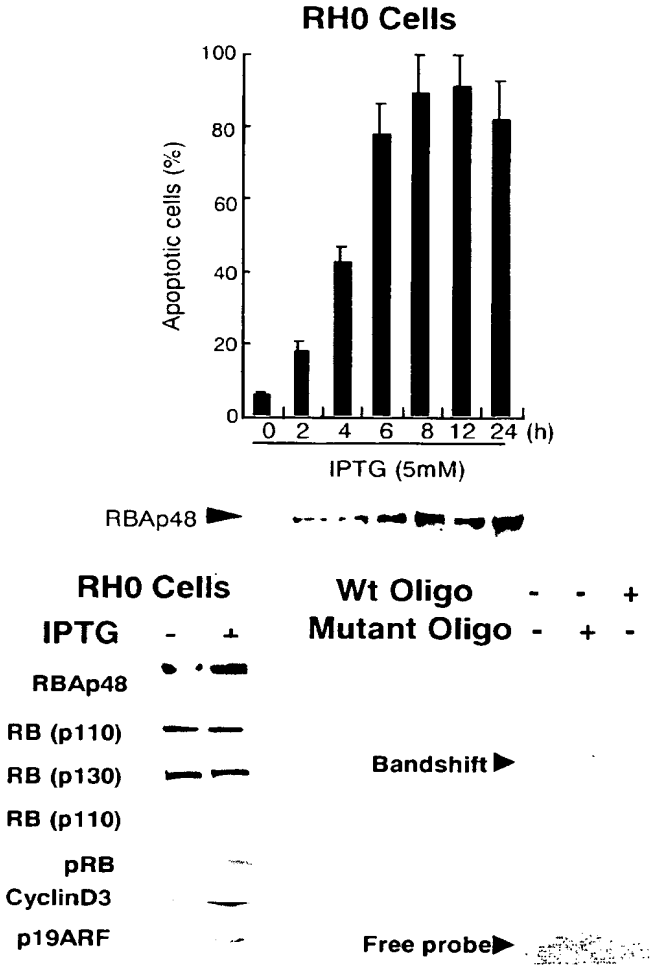
【図３】


Medium
Tam
E2+Tam
Tam-induced gene
β -actin
RBAp48 mRNA (Arbitary Unit)
20
15
10
5
0
0
2
6
24
(h)
Tamoxifen (10-7M)
RBAp48 mRNA (Arbitary Unit)
30
20
10
0
Heart
Brain
Spinal cord
Parotid
Esophagus
Stomach
Small Intestine
Colon
Rectum
Liver
Gallbladder
Throat
Trachea
Lung
Diaphragm
Skeletal muscle
Tongue
Adipose tissue
Kidney
Bladder
Prostate
Testis
Uterus
Ovary
Placenta
Thyroid
Pancreas
Adrenal
Tonsil
Thymus
Spleen
Lymph node
Breast
Appendix

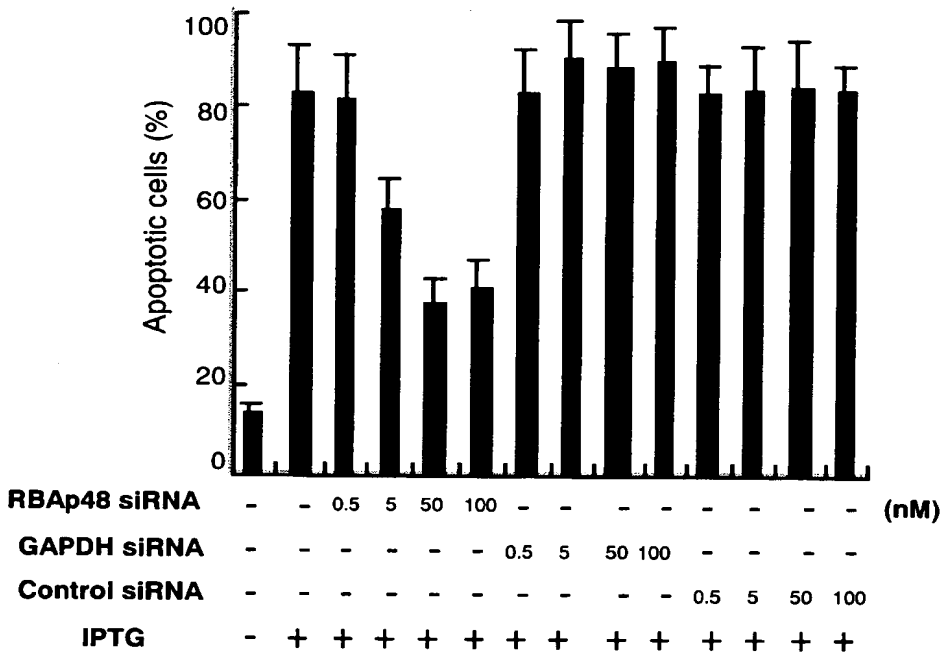
【図４】


RBAp48
Mock
Apoptotic cells (%)
60
40
20
0
MSG (B6)
MSG (p53-/-)
MSG (ER-/-)
HSG
MCF-7
Colo201
HT-29
CCSK
SH-SY5Y
Jurkat
Raji
THP-1
U937

【図５】


RH0 Cells
Apoptotic cells (%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 12 24 (h)
IPTG (5mM)
RBAp48
RH0 Cells
IPTG - +
RBAp48
RB (p110)
RB (p130)
RB (p110)
pRB
CyclinD3
p19ARF
Wt Oligo - - +
Mutant Oligo - + -
Bandshift
Free probe

【図６】


Apoptotic cells (%)
100
80
60
40
20
0
RBAp48 siRNA - - 0.5 5 50 100 - - - - - - - - (nM)
GAPDH siRNA - - - - - - 0.5 5 50 100 - - - -
Control siRNA - - - - - - - - - - 0.5 5 50 100
IPTG - + + + + + + + + + + + + +

【書類名】　要約書

【要約】

【課題】　従来は根本的治療法が知られていない自己免疫疾患の予防・治療剤、そのスクリーニング方法及び自己免疫疾患判定方法を得ることができる。

【解決手段】　本発明は、RBAp48産生抑制剤又は阻害剤を有効成分とする自己免疫疾患の予防・治療剤；被検体のRBAp48産生抑制作用又は阻害作用を測定することを特徴とする自己免疫疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法；さらには腺組織中RBAp48濃度測定試薬を含有することを特徴とする自己免疫疾患の診断剤又は診断用キット、並びに判定方法を提供するものである。

【選択図】　なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願２００３－１２３９５９
受付番号	５０３００７１４４０８
書類名	特許願
担当官	第一担当上席　　００９０
作成日	平成１５年　６月１６日

＜認定情報・付加情報＞

【提出日】　平成15年 4月28日

次頁無

特願２００３－１２３９５９

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　［０００１６３００６］

１．変更年月日　　１９９０年　８月２０日
［変更理由］　　新規登録
住　所　　愛知県名古屋市中区錦３丁目６番２９号
氏　名　　興和株式会社